

인간 폐섬유아세포에서 TGF- β 자극에 의한 VEGF 분비

성균관대학교 의과대학 강북삼성병원 소아청소년과

박상욱 · 신주화 · 심재원 · 김덕수 · 정혜림 · 박문수 · 심정연

= Abstract =

Transforming growth factor- β promoted vascular endothelial growth factor release by human lung fibroblasts

Sang Uk Park, M.D., Joo Hwa Shin, M.D., Jae Won Shim, M.D., Deok Soo Kim, M.D.
Hye Lim Jung, M.D., Moon Soo Park, M.D., and Jung Yeon Shim, M.D.

Department of Pediatrics, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Purpose : The human lung fibroblast may act as an immunomodulatory cell by providing pro-inflammatory cytokines and chemokines, which are important in airway remodeling. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces mucosal edema and angiogenesis. Thymus and activation regulated chemokine (TARC) induces selective migration of T helper 2 cells. We investigated whether human lung fibroblasts produced VEGF and TARC, and the effects were augmented with the co-culture of fibroblasts and human bronchial smooth muscle cells (HBSMC), and whether dexamethasone can inhibit the proliferation and the release of VEGF in lung fibroblasts.

Methods : Human lung fibroblasts were cultured with and without HBSMC, growth-arrested in serum-deprived medium, and pretreated with dexamethasone for 16 hours. After 24-hour stimulation with platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB) and/or transforming growth factor- β (TGF- β), culture supernatant was harvested for assays of VEGF and TARC. Cell proliferation was assayed using BrdU cell proliferation ELISA kit.

Results : 1) The release of VEGF was significantly increased after stimulation with TGF- β , and its release was augmented when co-stimulated with PDGF and TGF- β . 2) VEGF release induced by PDGF or TGF- β was inhibited by dexamethasone. 3) There was no synergistic effect on the release of VEGF when human lung fibroblasts were co-cultured with HBSMC. 4) Dexamethasone did not suppress human lung fibroblasts proliferations. 5) Neither TGF- β nor PDGF induced TARC release from lung fibroblasts.

Conclusion : Human lung fibroblasts may modulate airway remodeling by release of VEGF, but they have no synergistic effects when co-cultured with HBSMC. Dexamethasone suppresses VEGF release, not proliferation of lung fibroblast. (Korean J Pediatr 2008;51:879-885)

Key Words : Human lung fibroblast, Transforming growth factor- β , Vascular endothelial growth factor, Thymus and activation regulated chemokine, Dexamethasone

서 론

기관지 천식은 기도의 만성 염증 질환으로서, 그 기전은 T helper 2 (Th2) 세포의 과도한 염증반응과 기도 개형(airway

remodeling)으로 대표된다. 기도 개형은 망상 기저막의 비후, 섬유아세포와 근섬유아세포에서 탄성섬유와 교원섬유의 변형 및 fibronectin, laminin, tenascin의 점막하 침착으로 인한 세포 기질의 개형, 혈관 증식과 확장 및 미세혈관 누출 등의 혈관 개형, 기관지 평활근 세포의 비대와 증식, 술잔세포의 증가, 점액선의 증식 등에 의한다^{1,2)}. 인간의 폐섬유아세포(lung fibroblast)는 예전에는 기관지 벽을 구성하는 구조적인 세포로만 알려져 왔으나, 최근에는 기관지 평활근 세포와 더불어 사이토카인, 케모카인, 폴리펩티드 성장 인자, 세포외 간질 단백질을 생성 분비하는 면역 조절 세포로서 작용함이 밝혀지고 있다³⁾.

혈관 개형은 기도 개형에서 중요한 특징 중 하나로 이러한 혈관의 변화에 관여하는 물질로는 transforming growth factor-

Received : 2 January 2008, Revised : 12 June 2008, Accepted : 21 July 2008

Address for correspondence : Jung Yeon Shim, M.D.

Department of Pediatrics, Kangbuk Samsung Hospital, Sungkyunkwan University School of Medicine 108 Pyung-Dong, Jongno-Ku, Seoul 100-746, Korea
Tel : +82.2-2001-2200, Fax : +82.2-2001-2199

E-mail : jyssim@hotmail.com

The content of this paper was presented in Annual Spring Meetings of the Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease in Seoul, Korea, April 13-14, 2007.

β (TGF- β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), platelet derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) 등이 알려져 있으며, 이들은 종양세포, 혈관내피세포, 염증세포 등에서 분비된다⁴⁻⁶⁾.

이들 중 특히 VEGF는 혈관 내피세포에서 강력한 작용을 하는 다기능적 사이토카인으로, 혈관신생과 혈관투과성을 증가시키고, 상피내 세포의 분화를 유도하고 이동을 향상시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 기도벽의 혈관증식과 신생혈관형성은 기도 개형의 중요한 특징 중의 하나로서, 천식 환자의 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage)에서도 VEGF 농도가 증가한다^{7, 8)}.

TGF- β 는 혈관 개형, 기도 평활근 세포의 증식과 비대, 술잔 세포의 비대, 상피 세포층의 파괴, 상피세포하 섬유화에 관여하는 중요한 인자로서 천식 환자에서 TGF- β 가 증가되어 있고, 알레르겐에 노출시 더욱 증가된다고 알려져 있다^{9, 10)}. 본 저자들의 이전 연구에서 TGF- β 는 기도 평활근에서 PDGF와 더불어 VEGF 분비를 증가시킴을 확인하여 TGF- β 는 혈관 개형에도 중요한 사이토카인으로 생각된다¹¹⁾.

Thymus and activation regulated chemokine (TARC)은 Th2 세포의 선택적 이동을 유도하는 중요한 케모카인으로서 TARC의 농도는 급성 및 만성 소아 천식에서 증가하는 것으로 알려져 있다^{12, 13)}. 반면, 각막과 피부의 섬유아세포에서는 TARC의 분비가 증가하고 많은 양의 TARC mRNA가 존재하였으나, 폐섬유아세포에서는 그렇지 않다는 연구결과도 있다¹⁴⁾.

기관지 평활근 세포와 더불어 폐섬유아세포도 기도 개형에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 창상 치유와 조직 재생 과정 중에서 섬유아세포가 근섬유아세포(myofibroblast)로 분화하는데, 이 세포는 섬유아세포와 평활근 세포의 중간 형태로 여겨지며, 다시 근섬유아세포는 TGF- β 등에 의해 평활근 세포 표현형으로 분화한다고 알려져 있다¹⁵⁻¹⁸⁾. 이에 여러 연구에서 폐섬유아세포와 기관지 평활근 세포를 각각 배양하여 이들과 기도 개형과의 연관성 및 분화 과정을 확인하려는 노력을 해왔으나, 아직까지 폐섬유아세포와 기관지 평활근 세포를 혼합 배양한 연구는 없었다.

이에 본 연구에서는 PDGF와 TGF- β 로 자극시킨 인간의 폐섬유아세포에서 VEGF와 TARC가 생성되는지와 dexamethasone이 폐 섬유아세포에서 이들의 분비를 억제하는지, 또한 PDGF와 TGF- β 로 자극시킨 폐섬유아세포와 기관지 평활근 세포를 단독배양 그리고 혼합 배양했을 때 VEGF의 농도 변화를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포배양

인간 폐섬유아세포와 인간 기관지 평활근 세포주를 Clonetics

(San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. 75 cm²의 세포배양 플라스크에 10% fetal bovine serum (FBS)과 penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 μ g/mL를 포함한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 배지를 넣고 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 5-7일정도 배양하여 90% 세포가 포화되면 계대배양(subculturing)을 하였고, 3대에서 6대까지 계대배양한 세포를 사용하였다.

2. 세포증식 반응

96 well culture plate에 well당 5,000개의 세포를 분주하고 배양하여 70% 정도 포화 되었을 때 무혈청배지로 바꾸어 48시간 동안 세포증식을 억제하였다. 증식 반응을 보기 위해 TGF- β (10 ng/mL)와 PDGF (20 ng/mL)를 각각 혹은 함께 넣고 48시간 배양하였고, dexamethasone에 의한 억제 반응을 보기 위해 dexamethasone (10⁻⁶ M)으로 전처리 후 16시간 지난 뒤에 TGF와 PDGF로 자극하였다. 세포증식은 Bromodeoxyuridine (BrdU) cell proliferation ELISA kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)를 사용하여 측정하였다. 간단히 설명하면, 위의 조건에서 96 well culture plate에 한 well 당 10 uM BrdU를 넣고 DNA가 분열할 때 결합하는 BrdU 농도를 측정하였다. 24시간 배양 후 세포를 고정시키고 DNA를 변성(denaturation) 시킨 다음, 항-BrdU-POD 단클론 항체를 넣어 세포에 있는 BrdU에 결합시키고, 항원-항체 면역 복합체를 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 O.D 값을 측정하였다.

3. 폐섬유아세포에서 VEGF와 TARC 분비 측정

48 well culture plate에 well당 10,000개의 세포를 분주하고 배양하여 90% 정도 포화 되었을 때 무혈청배지로 바꾸어 48시간 동안 세포증식을 억제하였다. PDGF와 TGF- β 자극에 의한 VEGF와 TARC 분비 반응을 보기 위해 PDGF (20 ng/mL), TGF- β (10 ng/mL)를 각각 혹은 함께 자극하여 24시간 뒤 세포 배양 상층액을 수거하여 영하 80°C 냉장고에 보관하였다. Dexamethasone에 의한 VEGF와 TARC 억제 반응을 보기 위해 dexamethasone (10⁻⁶ M)을 넣고 16시간 지난 후에 PDGF (20 ng/mL)와 TGF- β (10 ng/mL)로 자극하여 24시간 뒤 세포 배양 상층액을 수거하였다.

4. 폐섬유아세포와 기관지 평활근 세포의 공동 혹은 단독 배양시 VEGF 분비 비교

폐섬유아세포와 기관지 평활근 세포를 함께 배양 했을 때 VEGF 분비에 대한 두 세포의 상호작용을 보기 위해 48 well culture plate에 폐섬유아세포와 기관지 평활근 세포를 각각 5,000개씩 한 well에 함께 넣거나 각각 따로 각 well 당 10,000개 세포가 되도록 넣고 상기와 같은 조건에서 배양하였다. 자극하지 않은 것파 PDGF와 TGF- β 를 각각 혹은 함께 자극하여 분비되는 VEGF 농도를 비교하였다.

5. VEGF와 TARC 농도 측정

Colorimetric Sandwich ELISA kit (R&D, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 혈청 VEGF, TARC 농도를 제조사의 방법으로 측정하였다. VEGF의 최소 측정 농도는 5 pg/mL, TARC의 최소 측정 농도는 7 pg/mL이었다.

6. 통계처리

자료의 통계학적 처리는 GraphPad Prism software 4.0 (GraphPad software Inc. San Diego, CA, USA) 통계 프로그램을 이용하였다. 두 군 간의 비교는 Mann-Whitney U test로, 세 군 이상의 비교는 Kruskal-Wallis test로 검정하였고 통계적 유의 수준은 P 값이 0.05 미만으로 하였다.

결 과

1. PDGF와 TGF- β 로 자극했을 때 폐섬유아세포 배양액에서 VEGF 농도의 변화

PDGF로 자극한 경우와 TGF- β 로 자극한 경우 배양액에서의 VEGF 농도는 각각 195.8 ± 8.4 pg/mL, 164.4 ± 10.7 pg/mL로 자극하지 않은 경우(78.9 ± 5.1 pg/mL)에 비해 통계적으로 의미있게 증가되었으며($P < 0.05$), 특히 PDGF와 TGF- β 로 함께 자극했을 경우에 514.9 ± 15.6 pg/mL로 각각 자극했을 때 보다 의미있게 증가하였다($P < 0.01$, Fig. 1).

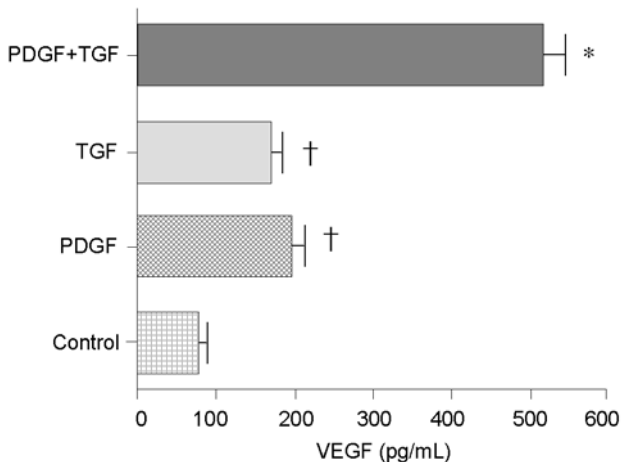


Fig. 1. Production of VEGF by PDGF- and TGF- β -stimulated lung fibroblasts. VEGF release was augmented when lung fibroblasts were stimulated with PDGF (20 ng/mL) and TGF- β (10 ng/mL) co-stimulation compared to no stimulation and stimulation with PDGF or TGF- β . VEGF production was also enhanced when stimulated with PDGF or TGF- β compared to no stimulation. * $P < 0.01$ vs TGF- β , PDGF and control. † $P < 0.05$ vs control.

2. Dexamethasone 전처리에 의한 폐섬유아세포 배양액에서 VEGF 농도의 변화

PDGF와 TGF- β 로 자극하기 전 dexamethasone으로 전처리한 경우는 전처리하지 않고 PDGF나 PDGF와 TGF- β 로 함께 자극한 경우보다 배양액의 VEGF 농도가 감소되었다. 즉 dexamethasone 10^{-6} M 전처리 후 PDGF 혹은 PDGF와 TGF- β 로 함께 자극한 경우의 VEGF 농도는 각각 54.8 ± 3.5 pg/mL, 240.0 ± 11.9 pg/mL로, 전처리 하지 않고 자극했을 때의 195.8 ± 8.4 pg/mL, 514.9 ± 15.5 pg/mL 보다 의미있게 VEGF 농도가 감소하였다(Fig. 2).

3. PDGF와 TGF- β 로 자극했을 때 폐섬유아세포의 증식 반응 변화

PDGF 자극에 의해 폐섬유아세포의 증식 반응이 증가하였다. 그러나 PDGF로만 자극한 경우에 비해 PDGF와 TGF- β (10 ng/mL, 30 ng/mL)로 함께 자극한 경우 폐섬유아세포의 증식이 더 증가되지는 않았다. 오히려 PDGF와 TGF- β 30 ng/mL를 함께 자극한 경우 폐섬유아세포의 증식이 감소하였다(Fig. 3A).

Dexamethasone이 PDGF에 의한 증식 반응을 억제하는지 보기 위해 PDGF, TGF- β 로 자극하기 전 dexamethasone으로 전처리 한 후 전처리 하지 않은 것과 비교하였다. 하지만 PDGF와 TGF- β 로 자극하기 전 dexamethasone으로 전처리한 경우는 전처리하지 않고 PDGF와 TGF- β 로 자극한 경우에 비해 폐섬유아세포의 증식을 억제시키지 못했다(Fig. 3B).

4. 폐섬유아세포를 인간 기관지 평활근 세포와 혼합배양했을 때 VEGF 농도의 변화

기관지평활근세포를 단독 배양한 경우(229.4 ± 23.6 pg/mL)

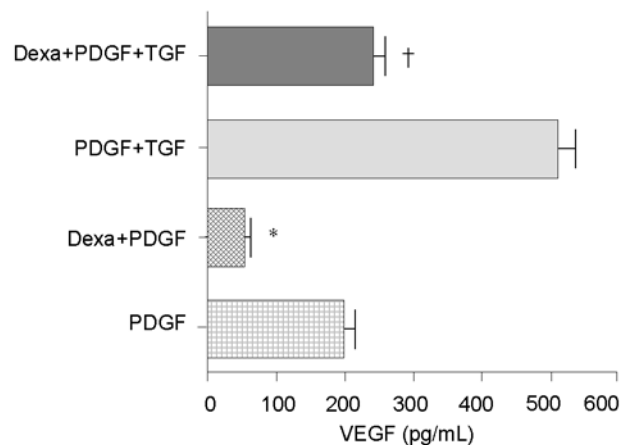


Fig. 2. Inhibition of VEGF production by dexamethasone. Lung fibroblasts were pretreated with dexamethasone (10^{-6} M) for 16 hours before stimulation with PDGF (20 ng/mL) and/or TGF- β (10 ng/mL). Dexamethasone significantly inhibited VEGF production by lung fibroblasts. * $P < 0.01$ vs PDGF. † $P < 0.01$ vs PDGF+TGF- β . Abbreviation : Dexa, dexamethasone.

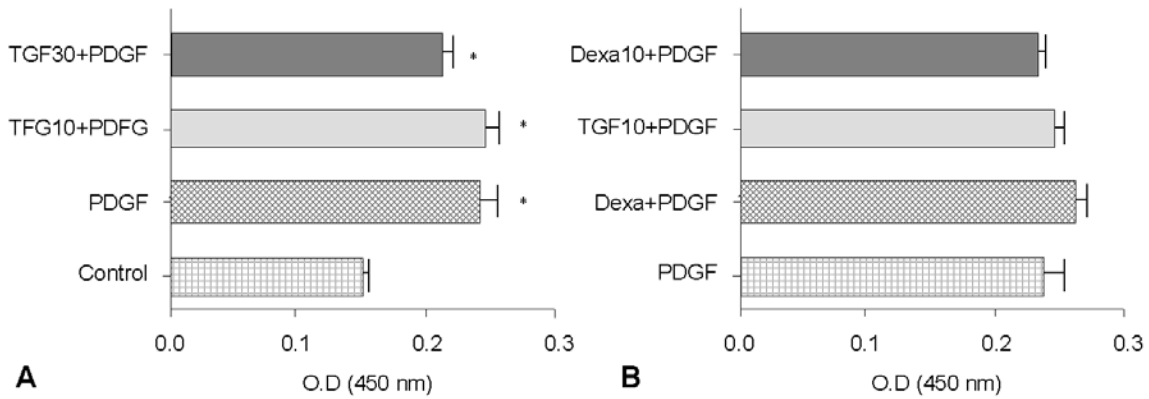


Fig. 3. Proliferation of lung fibroblasts stimulated with PDGF, TGF- β with and without dexamethasone pretreatment. (A) Proliferations of lung fibroblasts were promoted when stimulated with PDGF with and without TGF- β (10, 30 ng/mL) compared to control. (B) Dexamethasone (10^{-6} M) did not suppress PDGF-stimulated or TGF- β and PDGF co-stimulated lung fibroblasts proliferations. * $P < 0.01$ vs control. Abbreviations : TGF10, TGF- β 10 ng/mL; TGF30, TGF- β 30 ng/mL.

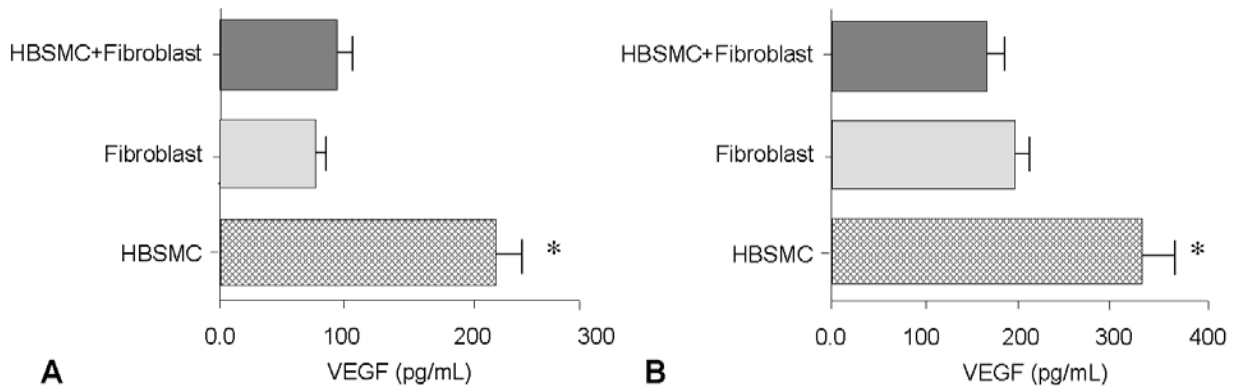


Fig. 4. VEGF release from HBSMC, lung fibroblasts and co-cultured cells stimulated with (A) and without (B) PDGF. (A) The spontaneous release of VEGF from HBSMC was significantly higher than that from fibroblasts and co-cultured cells. (B) The release of VEGF from HBSMC stimulated with PDGF was significantly increased compared to that from fibroblasts and co-cultured cells. * $P < 0.01$ vs fibroblasts and HBSMC+fibroblasts. Abbreviation : HBSMC, human bronchial smooth muscle cell.

에 폐섬유아세포를 단독 배양(78.9 ± 9.4 pg/mL) 혹은 기관지평활근세포와 폐섬유아세포를 혼합 배양한 경우(98.8 ± 10.4 pg/mL) 보다 VEGF 농도가 통계적으로 의미있게 증가되었다($P < 0.05$, Fig. 4A).

PDGF 자극 후 VEGF 농도는 기관지 평활근 세포 단독 배양한 경우(330.5 ± 39.0 pg/mL)에서 폐섬유아세포 단독 배양(195.8 ± 15.7 pg/mL)이나 기관지 평활근 세포와 폐섬유아세포 혼합 배양한 경우(168.4 ± 15.3 pg/mL)에 비해 통계적으로 의미 있게 증가되었다($P < 0.01$, Fig. 4B).

5. 폐섬유아세포와 기관지 평활근 세포에서 TARC의 분비 측정

폐섬유아세포와 기관지 평활근 세포를 자극하지 않은 경우와 PDGF나 TGF- β 로 각각 그리고 함께 자극한 후 배양액에서 TARC 농도를 측정하였을 때 TARC는 측정되지 않았다(Data not shown).

고찰

이번 연구에서 폐섬유아세포를 PDGF로 자극하였을 경우 VEGF 분비가 의미있게 증가하였다. 이러한 결과는 PDGF가 폐의 섬유화와 기관지 평활근의 증식 이외에 폐섬유아세포에서 VEGF의 발현을 증가시킴으로써 부종과 신생혈관 형성, 점액선의 증식 등의 기도 개형에 관여하고 있는 것으로 생각된다. PDGF는 섬유모세포와 기관지 평활근의 증식과 활성화에 관여하는 것으로 알려져 있는데, 천식환자의 호산구에서도 생성되며 천식이 있는 환자의 기관지폐포세척액이나 기관지 상피세포에서도 PDGF의 합성이 증가되어 있다^{19, 20}. 또한 PDGF는 섬유아세포의 성장과 이동, 분화를 조절하고, EGF, TGF- β 와 함께 세포외 기질 생성을 강하게 자극한다²¹. 쥐 실험에서도 PDGF가 기도저항을 감소시키고 기도벽의 비대를 억제함이 보고되어 PDGF가 기도 개형의 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다²².

천식환자의 기관지 조직검사에서 TGF- β 의 농도를 측정해 본 결과 TGF- β 가 증가할수록 상피화 섬유화가 증가하였고, 천식이 없는 환자에 비해 천식 환자의 기관지 폐포 세척액에서 TGF- β 의 분비가 증가되어 있었다²³⁻²⁵⁾. TGF- β 는 또한 천식에서 항염작용과 전섬유화 효과(profibrotic effect)가 있는 것으로 보고되고 있다²⁶⁻²⁸⁾. 이에 본 연구에서는 폐섬유아세포를 TGF- β 와 PDGF로 함께 자극하여 VEGF 농도를 측정한 결과 PDGF 단독으로 자극했던 경우보다 VEGF 분비가 현저하게 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 TGF- β 는 기존에 주로 알려졌던 섬유화에 작용하는 것 이외에 VEGF 발현을 통해서 신생 혈관 생성에도 작용하여 기도 개형을 일으킬 수 있을 것으로 생각된다.

또한 본 연구에서는 PDGF와 TGF- β 로 자극하기 전에 dexamethasone을 전처치하여 VEGF 농도를 측정하였다. Dexamethasone 전처치 후 PDGF로 자극하였을 경우와 PDGF와 TGF- β 로 함께 자극하였을 경우 모두 VEGF가 의미 있게 감소하였다. Dexamethasone이 폐섬유아세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 dexamethasone으로 전처치 후 PDGF, TGF- β 로 자극시켰을 때 폐섬유아세포의 증식이 억제되지 않았다. 본 연구에서는 정상인의 폐섬유아세포를 사용하여 실험하였는데, 천식환자의 폐섬유아세포를 사용한 다른 연구에서는 dexamethasone이 중증 천식환자의 폐섬유아세포 증식을 억제한 반면, 경증 천식환자의 폐섬유아세포 증식은 오히려 증가시켰으며, 본 연구의 결과와 마찬가지로 정상인의 폐섬유아세포 증식에는 변화가 없었다²⁹⁾. 또다른 연구에서는 dexamethasone이 천식환자의 폐섬유아세포에서 G1-S phase cell cycle transition을 자극하여 세포 증식을 증가시킨다는 보고도 있어³⁰⁾ dexamethasone과 세포 증식의 상관관계에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다.

스테로이드는 강한 항염증제로 심한 기관지 천식의 급성기 증상을 완화시키고, 중등증 이상의 지속적 천식에서 흡입제 형태로 조절제로 쓰이고 있다³¹⁾. 그러나 스테로이드가 기도 개형에 미치는 영향에 대해서는 아직도 논란의 여지가 많다. 본 연구에서 dexamethasone이 폐섬유아세포에서 성장인자에 의한 VEGF의 발현 증가를 억제한 것을 볼 때, dexamethasone은 혈관증식을 감소시켜 기도개형을 억제할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 폐섬유아세포의 증식을 억제하지 못한 결과에 의하면 기도의 구조적인 변화까지 억제할 수는 없는 것으로 여겨진다.

인간 기관지 평활근 세포는 천식에서 기관지 운동의 톤을 조절할 뿐만 아니라 기도의 면역조절과 기도 개형에 중요한 역할을 담당하고 있다³²⁾. 기관지 평활근세포와 더불어 폐섬유아세포도 예전에는 구조적인 세포로만 알려져 왔으나, 최근에는 전염증성 사이토카인, 케모카인, 폴리펩티드 성장인자, 그리고 세포의 기질 단백질들을 생성, 분비하는 면역 조절 세포로서 작용함이 밝혀지고 있다^{1, 3)}. IL-4, IL-13같은 Th2 사이토카인이 인간 기관지 평활근 세포에서 VEGF의 분비를 유도한다는 보고가 있었으며³³⁾, 또한 혈관 내피세포와 평활근 세포의 혼합 배양에서 VEGF가 증

가되어 있는 것으로 보아 VEGF가 혈관 내피세포의 bFGF와 TGF- β 의 modulation을 통해 간접적으로 평활근 세포의 증식과 이동을 자극하는 것으로 보인다³⁴⁾. 그러나 아직까지 폐섬유아세포의 단독배양, 기관지 평활근 세포와 폐섬유아세포의 혼합배양시 VEGF 농도의 변화에 대해서는 알려지지 않았다. 이에 본 연구에서는 인간 기관지 평활근 세포와 폐섬유아세포의 상호작용을 알아보기 위해 단독배양, 혼합 배양한 후 VEGF 농도를 비교해 보았는데, 혼합 배양한 경우가 기관지 평활근 세포 단독 배양보다 VEGF 분비가 오히려 적었다. 그 이유는 VEGF 분비가 폐섬유아세포보다는 기관지 평활근 세포에서 더 많이 분비되기 때문으로 생각되고, 두 세포사이의 상호 작용에 의한 VEGF 분비의 상승 효과는 없는 것으로 생각된다. 이것은 PDGF로 자극한 경우와 자극하지 않은 경우에서 모두 같은 소견을 보였다.

TARC는 TNF- α , IL-4에 의해 사람 각막의 섬유아세포에서 발현이 증가되었다는 보고가 있었고¹²⁾, 다른 연구에서는 TNF- α 와 IL-4, IL-13 같은 Th2 사이토카인에 의해 사람의 각막과 피부의 섬유아세포에서 TARC 단백질의 분비와 TARC mRNA의 양이 증가되었다는 보고가 있었다¹⁴⁾. 이에 본 연구에서는 PDGF, TGF- β 로 자극한 후 기관지 평활근 세포와 폐섬유아세포 배양액에서 TARC를 측정하였으나 TARC가 측정되지 않았다. 이 결과로 보아 기관지 평활근 세포나 폐섬유아세포는 TARC 분비를 하지 않을 것으로 생각되지만, 이번 연구에서 Th2 사이토카인으로 자극을 하지 않았기 때문에 이에 대한 가능성도 있을 것으로 생각된다.

결론적으로 이번 연구에서 폐섬유아세포는 PDGF와 TGF- β 자극에 의해 VEGF 생성 및 분비가 증가되었으며, 이러한 결과는 PDGF와 TGF- β 가 신생혈관 형성과 혈관 투과성에 영향을 주어 기도개형에 관여하고 있음을 뒷받침한다. 또한 dexamethasone은 PDGF와 TGF- β 의 자극에 대한 폐섬유아세포의 VEGF 생성 및 분비를 억제하지만 폐섬유아세포의 증식은 억제하지 못하였다.

요 약

목적 : 폐섬유아세포는 예전에는 기도의 구조적 세포로만 알려져 왔으나, 최근에는 천식에서 기관지 운동의 톤을 조절할 뿐만 아니라 기도의 면역조절과 기도 개형에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있다. VEGF는 혈관 내피세포에서 강력한 작용을 하는 다기능적 사이토카인으로서, 상피내 세포의 세포분열을 유도하고, 상피세포의 투과도를 증가시키며, 상피세포의 이동을 향상시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. TARC는 Th2 세포의 선택적 이동을 유도하는 케모카인으로 알려져 있다. 본 연구에서는 PDGF와 TGF- β 로 자극시킨 인간 폐섬유아세포에서 VEGF와 TARC가 생성되는지와 dexamethasone이 폐섬유아세포에서 VEGF의 분비를 억제하는지를 알아보고자 하였다. 또한 폐섬유아세포와 기관지 평활근 세포와 함께 배양했을 때 VEGF

생성에 미치는 효과를 단독배양 시와 비교하였다.

방법 : 폐섬유아세포와 인간 기관지 평활근세포를 각각 혹은 함께 배양한 뒤 48시간동안 무혈청 배지에서 성장을 정지시킨 후 TGF- β (10 ng/mL)와 PDGF (20 ng/mL)로 자극하였다. 자극 후의 세포 증식 반응과 배양액 상층액의 VEGF, TARC 농도를 측정하여 dexamethasone (10^{-6} M)으로 전처리 후 자극한 것과 비교하였다.

결과 : PDGF와 TGF- β 로 자극하였을 경우 폐섬유아세포에서 VEGF 분비가 의미있게 증가하였고, 특히 PDGF와 TGF- β 로 함께 자극하였을 경우 더욱 의미있는 상승을 보였다. Dexamethasone은 폐섬유아세포의 VEGF 분비를 PDGF로 자극한 경우와 PDGF, TGF- β 같이 자극한 경우 모두에서 억제하였다. 인간 기관지 평활근 세포와 폐섬유아세포를 혼합 배양했을 때 VEGF 분비에는 상승적인 효과가 없었다. Dexamethasone은 폐섬유아세포 증식을 억제시키지 않았다. 폐섬유아세포를 PDGF와 TGF- β 로 자극했을 때 TARC는 분비되지 않았다.

결론 : 폐섬유아세포는 VEGF 분비를 통해 기도 개형에 관여하며, 기관지 평활근 세포와 함께 배양해도 VEGF 분비에 상승 효과는 없다. Dexamethasone은 VEGF 분비를 억제하였으나 폐섬유아세포의 증식을 억제하지는 못하였다.

References

- Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, et al. Airway remodeling in asthma. *Chest* 2003;123:417-22.
- Woodruff PG, Fahy JV. Airway remodeling in asthma. *Semin Respir Crit Care Med* 2002;23:361-7.
- Kunzmann S, Schmidt-Weber C, Zingg JM, Azzi A, Kramer BW, Blaser K, et al. Connective tissue growth factor expression is regulated by histamine in lung fibroblasts: potential role of histamine in airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1398-407.
- Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-7.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-9.
- Anan K, Morisaki T, Katano M, Ikubo A, Kitsuki H, Uchiyama A, et al. Vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor are potential angiogenic and metastatic factors in human breast cancer. *Surgery* 1996;119:333-9.
- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4-25.
- Lee KS, Min KH, Kim SR, Park SJ, Park HS, Jin GY, et al. Vascular endothelial growth factor modulates matrix metalloproteinase-9 expression in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:161-70.
- Makinde T, Murphy RF, Agrawal DK. The regulatory role of TGF-beta in airway remodeling in asthma. *Immunol Cell Biol* 2007;85:348-56.
- Wen FQ, Liu X, Manda W, Terasaki Y, Kobayashi T, Abe S, et al. TH2 Cytokine-enhanced and TGF-beta-enhanced vascular endothelial growth factor production by cultured human airway smooth muscle cells is attenuated by IFN-gamma and corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:1307-18.
- Yoo MH, Shim JY, Seo BG, Kim DS, Shim JW, Jung HL, et al. Dexamethasone attenuates PDGF- and TGF-beta-enhanced Vascular endothelial growth factor production in cultured human bronchial smooth muscle cells. *Pediatr Allergy Respir Dis (Korea)* 2006;16:142-9.
- Kumagai N, Fukuda K, Nishida T. Synergistic effect of TNF- α and IL-4 on the expression of thymus- and activation-regulated chemokine in human corneal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:1-5.
- Heijink IH, Marcel Kies P, van Oosterhout AJ, Postma DS, Kauffman HF, Vellenga E. Der p, IL-4, and TGF-beta cooperatively induce EGFR-dependent TARC expression in airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;36:351-9.
- Fukuda K, Fujitsu Y, Seki K, Kumagai N, Nishida T. Differential expression of thymus- and activation-regulated chemokine (CCL17) and macrophage-derived chemokine (CCL22) by human fibroblasts from cornea, skin, and lung. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:520-6.
- Abraham DJ, Eckes B, Rajkumar V, Krieg T. New developments in fibroblast and myofibroblast biology: implications for fibrosis and scleroderma. *Curr Rheumatol Rep* 2007;9:136-43.
- Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 2007;127:526-37.
- Wicks J, Haitchi HM, Holgate ST, Davies DE, Powell RM. Enhanced upregulation of smooth muscle related transcripts by TGF beta2 in asthmatic (myo) fibroblasts. *Thorax* 2006;61:313-9.
- Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 2005;13:7-12.
- Ross R, Bowen-Pope DF, Raines EW. Platelet-derived growth factor: its potential roles in wound healing, atherosclerosis, neoplasia, and growth and development. *Ciba Found Symp* 1985;116:98-112.
- Raines EW, Ross R. Platelet-derived growth factor. I. High yield purification and evidence for multiple forms. *J Biol Chem* 1982;257:5154-60.
- Malmstrom J, Tufvesson E, Lofdahl CG, Hansson L, Marko-Varga G, Westergren-Thorsson G. Activation of platelet-derived growth factor pathway in human asthmatic pulmonary-derived mesenchymal cells. *Electrophoresis* 2003;24:276-85.
- Yamashita N, Sekine K, Miyasaka T, Kawashima R, Nakajima Y, Nakano J, et al. Platelet-derived growth factor is involved in the augmentation of airway responsiveness through remodeling of airways in diesel exhaust particulate-treated mice. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:135-42.
- Redington AE, Madden J, Frew AJ, Djukanovic R, Roche WR, Holgate ST, et al. Transforming growth factor-beta 1 in asthma. Measurement in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:642-7.

- 24) Minshall EM, Leung DY, Martin RJ, Song YL, Cameron L, Ernst P, et al. Eosinophil-associated TGF- β 1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:326-33.
- 25) Ohno I, Nitta Y, Yamauchi K, Hoshi H, Honma M, Woolley K, et al. Transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) gene expression by eosinophils in asthmatic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15:404-9.
- 26) Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000;342:1350-8.
- 27) Hansen G, McIntire JJ, Yeung VP, Berry G, Thorbecke GJ, Chen L, et al. CD4(+) T helper cells engineered to produce latent TGF- β 1 reverse allergen-induced airway hyper-reactivity and inflammation. *J Clin Invest* 2000;105:61-70.
- 28) Nakao A. Is TGF- β 1 the key to suppression of human asthma? *Trends Immunol* 2001;22:115-8.
- 29) Kraft M, Lewis C, Pham D, Chu HW. IL-4, IL-13, and dexamethasone augment fibroblast proliferation in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:602-6.
- 30) Fouty B, Moss T, Solodushko V, Kraft M. Dexamethasone can stimulate G1-S phase transition in human airway fibroblasts in asthma. *Eur Respir J* 2006;27:1160-7.
- 31) Panettieri RA Jr, Kotlikoff MI, Gerthoffer WT, Hershenson MB, Woodruff PG, Hall IP, et al. Airway smooth muscle in bronchial tone, inflammation, and remodelling: basic knowledge to clinical relevance. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:248-52.
- 32) Hvizdos KM, Jarvis B. Budesonide inhalation suspension: a review of its use in infants, children and adults with inflammatory respiratory disorders. *Drugs* 2000;60:1141-78.
- 33) Faffe DS, Flynt L, Bourgeois K, Panettieri RA Jr, Shore SA. Interleukin-13 and interleukin-4 induce vascular endothelial growth factor release from airway smooth muscle cells: role of vascular endothelial growth factor genotype. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:213-8.
- 34) Cucina A, Borrelli V, Randone B, Coluccia P, Sapienza P, Cavallaro A. Vascular endothelial growth factor increases the migration and proliferation of smooth muscle cells through the mediation of growth factors released by endothelial cells. *J Surg Res* 2003;109:16-23.